

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09005240 A**(43) Date of publication of application: **10.01.97**

(51) Int. Cl.

**G01N 21/78**  
**G01N 27/27**  
**G01N 27/416**  
**G01N 33/52**

(21) Application number: **08152299**(22) Date of filing: **13.06.96**(30) Priority: **13.06.95 DE 95 19521019**(71) Applicant: **BOEHRINGER MANNHEIM GMBH**

(72) Inventor: **HOENES JOACHIM**  
**KOTZAN HOLGER**  
**VOLKER UNKRIG**  
**MICHEL MARQUANT**

(54) **METHOD FOR SIMULTANEOUSLY CARRYING  
 OUT COLORIMETRIC MEASUREMENT AND  
 ELECTROCHEMICAL MEASUREMENT OF BODY  
 TO BE DETECTED AND TEST MEDICINE**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for measuring a body to be detected by simultaneously carrying out a colorimetric measurement and an electrochemical measurement with the use of an oxidizing enzyme and a color original body accepting electrons from the enzyme.

SOLUTION: A color original body A forms a

color-developed substance A'B as a result of a coupling reaction with a substance BX after oxidized to a compound A. The concentration of the substance A'B is colorimetrically measured to indicate the presence or amount of a body to be detected. At the same time, a cleavage of an atomic group X<sup>-</sup> from the BX which can be electrochemically measured is brought about by the coupling reaction. The concentration of this X<sup>-</sup> is electrochemically measured as the amount of the body to be detected. Accordingly, the colorimetric measurement electrochemical measurement can be performed at the time for the object to be detected.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-5240

(43) 公開日 平成9年(1997) 1月10日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 21/78			G 0 1 N 21/78	
27/27			33/52	Z
27/416			27/46	C
33/52				G

審査請求 未請求 請求項の数17 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願平8-152299	(71) 出願人	591215177 ベーリンガー マンハイム ゲーエムベー ハー ドイツ連邦共和国 68298 マンハイム, サントホファーシュトラッセ 116
(22) 出願日	平成8年(1996) 6月13日	(72) 発明者	ヨアヒム ヘーネス ドイツ連邦共和国 ディー-64673 ツヴ インゲンベルグ, ログオアー シュトラー セ 50エイ番地
(31) 優先権主張番号	1 9 5 2 1 0 1 9 : 0	(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外2名)
(32) 優先日	1995年6月13日		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 被検体の比色測定と電気化学的測定を同時に行う方法および試験薬

(57) 【要約】

【課題】 酸化酵素と、この酵素から電子を受容する色原体Aを用いて、比色測定と電気化学的測定を同時に行うことにより被検体を測定する方法を提供する。

【解決手段】 酸化酵素と、該酵素から電子を受容する色原体Aを用いる被検体の測定法であって、色原体Aが、化合物A' に還元された後、物質B Xとカップリング反応を行って発色物質A' Bを形成し、このA' Bの濃度を被検体の存在または量の尺度として比色測定すると同時に、上記カップリング反応によって、電気化学的に測定可能な原子団X<sup>-</sup> がB Xから開裂して生成し、このX<sup>-</sup> の濃度を被検体の量の尺度として電気化学的に測定することを特徴とする、被検体の比色測定と電気化学的測定を同時に行う方法。

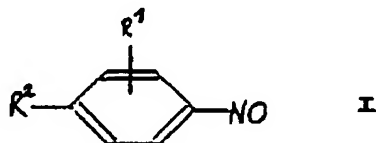
## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 酸化酵素と、該酵素から電子を受容する色原体Aを用いる被検体の測定法であって、色原体Aが、化合物A'に還元された後、物質BXとカップリング反応を行って発色物質A'Bを形成し、このA'Bの濃度を被検体の存在または量の尺度として比色測定すると同時に、上記カップリング反応によって、電気化学的に測定可能な原子団X<sup>-</sup>がBXから開裂して生成し、このX<sup>-</sup>の濃度を被検体の量の尺度として電気化学的に測定することとを特徴とする、被検体の比色測定と電気化学的測定を同時に行う方法。

【請求項2】 色原体Aが、電子密度の高い芳香族ニトロ化合物であって、還元されるとカップリング可能なイミノ化合物を形成する、請求項1記載の方法。

【請求項3】 色原体が式Iの化合物である、請求項2記載の方法。

## 【化1】



式Iにおいて、R<sup>1</sup>は、水素原子、水酸基、アルキル基、アルコキシ基、アルキルチオ基、アリールオキシ基、アリールチオ基、ハロゲンまたはアミノ基を表し、上記のアルキル基は、水酸基、COOH、PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>またはSO<sub>3</sub>Hで置換されていてもよくまた、上記のアミノ基はアルキル基（水酸基、PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、ジアルキルホスフィニル基、SO<sub>3</sub>HまたはCO<sub>2</sub>Hで置換されていてもよい）で一または多置換されていてもよい；R<sup>2</sup>は、水酸基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アリールチオ基またはアルキルチオ基を表し、これらの置換基中のアルキル残基は水酸基、アルコキシ基またはアミノ基（アルキル基で一または多置換されていてもよい）によって置換されていてもよく、あるいは、R<sup>2</sup>は、PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、SO<sub>3</sub>HまたはCO<sub>2</sub>Hの、酸そのままの形または塩の形、すなわち、アンモニウム塩、アルカリ塩またはアルカリ土類金属塩を示し、あるいは、R<sup>2</sup>はアミノ基NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>を示し、ここで、R<sup>3</sup>とR<sup>4</sup>は同一でも異なってもよく、水素、アリール基またはアルキル基を表し、このアリール基またはアルキル基は、水酸基、アルコキシ基、ヒドロキシアルコキシ基、任意に水酸基で置換されたポリアルコキシ基、酸そのままの形または塩の形のPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、SO<sub>3</sub>H、COOH、またはアミノ基（アルキル基で一または多置換されていてもよい）で置換されていてもよく、あるいは、R<sup>3</sup>とR<sup>4</sup>は、鎖中に酸素、硫黄または窒素が介在してもよいアルキレン残基を表し、この場合、窒素はアルキル基、ヒドロキシアルキル基、ヒドロキシアルコキシアルキル基、アルコキシヒドロキシアルキル基、アルコキシカル

ボニルアルキル基、ジオキサニルアルキル基またはポリアルコキシアルキル基で置換されており、これらの置換基はそれぞれアルキル基の部分が水酸基で置換されていてもよい；あるいはR<sup>1</sup>がNR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>に対してオルト位にある場合には、R<sup>3</sup>またはR<sup>4</sup>はR<sup>1</sup>と共同してアルキレン残基を表す。

【請求項4】 色原体が一般式IIで表される化合物である、請求項2記載の方法。

## 【化2】



一般式IIにおいて、X-YはNR<sup>5</sup>-COまたはN=C R<sup>6</sup>を表す；R<sup>5</sup>は水素、アルキル基を表し、このアルキル基は、水酸基、カルボキシ基、SO<sub>3</sub>H、PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、ジアルキルホスフィニル基で置換されていてもよい；R<sup>6</sup>は水素、アルキル基、アルケニル基、アルコキシ基、アルキルチオ基、アリール基、アリールチオ基、アラール基を表し、これらの置換基は、それぞれ水酸基、カルボキシ基、SO<sub>3</sub>H、PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、これらの酸の塩、または／およびアルコキシカルボニル基で置換されていてもよく、あるいは、R<sup>6</sup>はアミノ基を示し、このアミノ基は、アルキル基（一または数個の水酸基、カルボキシ基または／およびアルコキシカルボニル基を有していてもよい）で一または二置換されていてもよく、アミノ基がアルキル残基で二置換されている場合には、2つのアルキル残基は閉じて環を形成でき、この環は、窒素原子に加えて、環中に酸素、硫黄、または別の窒素原子が介在してもよく、あるいは、R<sup>6</sup>はアミノ基を表し、このアミノ基は一または二個のアシル基、アルコキシ基または／およびアラールコキシカルボニル基、H<sub>2</sub>N-CO、アルキル基、アラール基、または／およびアリールカルバモイル基によって置換されていてもよく、あるいは、R<sup>6</sup>は、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、カルボキシアミド基またはハロゲンを示す；R<sup>7</sup>は、アルキル基、チオアルキル基またはアラール基を表し、これらは水酸基、カルボキシ基、SO<sub>3</sub>HまたはPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>で置換されていてもよく、あるいは、R<sup>7</sup>はアミノ基を示し、このアミノ基はアルキル基（水酸基、カルボキシ基、SO<sub>3</sub>H、ジアルキルホスフィニル基またはPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>で置換されていてもよい）で一または二置換されていてもよい；ただし、R<sup>6</sup>およびR<sup>7</sup>の少なくともどちらか一方はアミノ基を表す；R<sup>8</sup>はアルキル基またはアラール基を表し、これらは水酸基、カルボキシ基、SO<sub>3</sub>HまたはPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>で置換されていてもよい。

【請求項5】 カップリング可能な物質BXが、容易に置換され得る置換基Xを有する芳香族化合物である、請

請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】 BXが、ハロゲンまたはスルホン酸で置換されたフェノール、ナフトール、アニリンまたはナフチルアミンである、請求項5記載の方法。

【請求項7】 カップリング可能な物質BXが、1-ナフトール-4-スルホン酸であって、カップリング反応により開裂してSO<sub>3</sub>H基を生成する、請求項6記載の方法。

【請求項8】 カップリング可能な物質BXが、2, 4, 6-トリハロゲン-3-ヒドロキシ安息香酸、2, 4-ジハロゲン-1-ナフトール、4-モノハロゲンフェノールまたは4-モノハロゲン-1-ナフトールであって、開裂してハロゲン化物イオンを生成する、請求項6記載の方法。

【請求項9】 原子団X<sup>•</sup> が電位差測定により測定される、請求項7記載の方法。

【請求項10】 原子団X<sup>•</sup> が電流測定により測定される、請求項8記載の方法。

【請求項11】 被検体の比色測定および電気化学的測定を同時に行うための、酸化酵素と該酵素から電子を受容する色原体Aを含有する試験薬であって、色原体Aに加えて物質BXを含有し、色原体Aが還元された後、物質BXとカップリング反応を行って発色物質A'Bを形成すると同時に、物質BXの開裂により、電気化学的に測定可能な原子団X<sup>•</sup> を生成するものであり、さらに、開裂された原子団X<sup>•</sup> の存在または濃度を電気化学的に測定するためのセンサー電極を有する試験薬。

【請求項12】 色原体Aが電子密度の高い芳香族ニトロ化合物である、請求項11記載の試験薬。

【請求項13】 物質BXが、容易に置換し得る、電気化学的に測定可能な離脱基X<sup>•</sup> を有する、フェノールまたはナフトール化合物、またはアニリンまたはナフチルアミンである、請求項11または12に記載の試験薬。

【請求項14】 物質BXが、1-ナフトール-4-スルホン酸である、請求項13記載の試験薬。

【請求項15】 BXが、2, 4-ジハロゲン-1-ナフトール、4-モノハロゲンフェノール、4-モノハロゲン-1-ナフトールまたは2, 4, 6-トリハロゲン-3-ヒドロキシ安息香酸である、請求項13記載の試験薬。

【請求項16】 酵素から色原体Aへの電子伝達のための媒介物質をさらに含む、請求項11-14のいずれか一項に記載の試験薬。

【請求項17】 発色物質A'Bの存在または濃度を定量するための光学測定装置をさらに含む、請求項11-16のいずれか一項に記載の試験薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、酸化酵素を用いて被検体の比色測定および電気化学的測定を同時に行うた

めの方法および試験薬に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 分析学において、酵素的酸化の利用により、様々な試料中の物質の検出および定量が可能になる。この分析過程において、酸化酵素は酸化反応による電子を受け取る電子受容体の存在下、固有の酵素基質に作用する。比色検出反応の場合には、電子受容体は色原体であって、還元されると、単独で、または他の物質の存在下で発色したり、色が変化したりすることにより、酵素基質の存在を示す。比色検出反応は、測光的にまたは好ましくは可視手段により評価することができ、特に、被検体の濃度が低い場合に有利である。一般的に、10<sup>-4</sup>M以上の高い被検体濃度では、吸光度の変化が溶液中で1以上となり、測定困難なほどに大きくなってしまふ。乾燥した試験担体上での反射率測定の場合には、特に困難となる。

【0003】 酸化酵素、すなわち、オキシダーゼとデヒドロゲナーゼのための合成電子受容体は数多く知られている。例として、たとえばEP-A-0 330 517に記載されているものがあげられる。酸化酵素を利用して被検体を定量するもう一つの方法として、電気化学的測定がある。電気化学的測定においては、電極そのものが、酵素による電子の電子受容体として働き、それに対応した電流が測定される。このような方法は、たとえば、EP-A-0 127 958に記載されている。濃度と電流の関係は基本的に直線的なので、電気化学的測定は特に被検体の濃度が高い場合に適している。

【0004】 EP-A-0 094 161には、PQ-Q-依存性デヒドロゲナーゼと電子受容体としての色原体を用いた被検体の検出が記載されており、この場合には色原体の還元が電気化学的にも観察されと考えられている。しかし、これを実際に実施する方法としては、単に、還元可能な電子受容体の還元型と酸化型の間の濃度の変化を電位差測定すると述べられているにすぎない。電子は、原則として、色原体か電極かのどちらかを還元するのに使われて、両方を同時に還元することはできないため、上記のような発色反応において、同時に電流を測定することは不可能である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 そこで、色原体の還元により発色すると同時に、その一方で、形成された発色物質とは異なる化合物を電流測定か電位差測定により、被検体の量の尺度として測定できるような、電気化学的測定と比色測定を組み合わせた測定方法が必要となった。このような方法によれば、比色測定の利点と、電気化学的測定の利点を組み合わせることが可能になり、それらが相互に補完しあえる。本発明は、とりわけ、高い被検体濃度範囲においても均一な精度をもたらすことを目的としたものである。この目的は、特許請求の範囲に記載された方法と試験薬により達成された。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、酸化酵素および還元の際にこの酵素から電子を受容する色原体Aを用いて、比色測定と電気化学的測定を同時に行う方法に関するものであって、以下のような特徴がある。すなわち、この色原体Aは還元されてA'となった後、物質B Xとカップリング反応を行い、発色物質A' Bを形成するが、この発色物質A' Bの濃度を被検体の存在または量の尺度として比色測定する。また、このカップリング反応中に、電気化学的に測定可能な原子団X<sup>-</sup>が開裂により生成し、このX<sup>-</sup>の濃度を被検体の量の尺度として電気化学的に測定するというものである。

【0007】本発明はまた、被検体の比色測定と電気化学的測定を同時に行うための、酸化酵素および還元の際にこの酵素から電子を受容する色原体Aを含有する試験薬に関するもので、以下のような特徴がある。すなわち、この試験薬は、色原体Aに加えて、物質B Xを含有し、色原体Aは、還元された後この物質B Xとカップリング反応を行い、発色物質A' Bを形成し得る。このカップリング反応は電気化学的に測定可能な原子団X<sup>-</sup>の開裂反応をとまう。それに加えて、本発明には、開裂した原子団X<sup>-</sup>の量または濃度を電気化学的に測定するためのセンサー電極が含まれる。

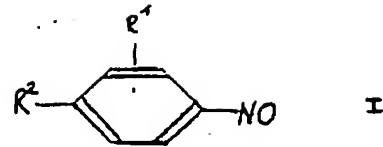
【0008】合成基質Aへの電子の伝達を伴って被検体を酸化する酸化酵素として、すべての酵素が考慮される。この過程において、電子が酵素から合成基質Aに直接伝達される必要はなく、フェナジンメトスルフェートまたはジアホラーゼのような媒介物質を介しても伝達され得る。酸化酵素はオキシドレダクターゼとして知られているもので、具体的には、オキシダーゼ、NAD依存性またはPQQ依存性デヒドロゲナーゼがあげられるが、デヒドロゲナーゼが特に好ましい。

【0009】本発明によれば、色原体Aとしては、還元後カップリング能のある化合物A'を生成するあらゆる物質が含まれると理解すべきであり、このA'が別の物質とカップリングして今度は発色物質を生成し、その最大の吸光度変化が可視または近赤外の領域、すなわち450から950nmの間においておこるものである。芳香族化合物から誘導されるイミノ化合物が、カップリング可能な還元体A'として特に好ましい。特に、EP-A-0 620 283に記載されるようなキノンジミンが好ましく、この特許の全内容を参照されたい。これらは芳香族ニトロソ化合物の還元によって作られる。

【0010】一般式Iのニトロソベンゼン誘導体が特に好ましい。

【0011】

【化3】



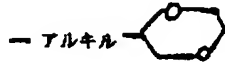
【0012】式Iにおいて、R<sup>1</sup>は、水素原子、水酸基、アルキル基、アルコキシ基、アルキルチオ基、アリールオキシ基、アリールチオ基、ハロゲンまたはアミノ基を表し、上記のアルキル基は、水酸基、COOH、PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>またはSO<sub>3</sub>Hで置換されていてもよく、また、上記のアミノ基はアルキル基（水酸基、PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、ジアルキルホスフィニル基、SO<sub>3</sub>HまたはCO<sub>2</sub>Hで置換されていてもよい）で一または多置換されていてもよい；R<sup>2</sup>は、水酸基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アリールチオ基またはアルキルチオ基を示し、これらの置換基中のアルキル残基は水酸基、アルコキシ基またはアミノ基（アルキル基で一または多置換されていてもよい）によって置換されていてもよく、あるいは、R<sup>2</sup>は、PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、SO<sub>3</sub>HまたはCO<sub>2</sub>Hの、酸そのまの形または塩の形、すなわち、アンモニウム塩、アルカリ塩またはアルカリ土類金属塩を示し、あるいは、R<sup>2</sup>はアミノ基NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>を示し、ここで、R<sup>3</sup>とR<sup>4</sup>は同一でも異なってもよく、水素、アリール基またはアルキル基を表し、このアリール基またはアルキル基は、水酸基、アルコキシ基、ヒドロキシアルコキシ基、任意に水酸基で置換されたポリアルコキシ基、酸そのまの形または塩の形のPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、SO<sub>3</sub>H、COOH、またはアミノ基（アルキル基で一または多置換されていてもよい）で置換されていてもよく、あるいは、R<sup>3</sup>とR<sup>4</sup>は、鎖中に酸素、硫黄または窒素が介在してもよいアルキレン残基を表し、この場合、窒素はアルキル基、ヒドロキシアルキル基、ヒドロキシアルコキシアルキル基、アルコキシヒドロキシアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、ジオキサニルアルキル基またはポリアルコキシアルキル基で置換されており、これらの置換基はそれぞれアルキル基の部分が水酸基で置換されていてもよい；あるいはR<sup>1</sup>がNR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>に対してオルト位にある場合には、R<sup>3</sup>またはR<sup>4</sup>はR<sup>1</sup>と共同してアルキレン残基を表す。

【0013】上記において、ハロゲンはフッ素、塩素、臭素およびヨウ素を示す。フッ素と塩素が特に好ましい。アルキル基、アルコキシ基、アルキルチオ基中のアルキルは、炭素原子数1-6の炭化水素残基を示し、特に、炭素原子数1-3の残基が好ましい。このアルキルの定義は、ヒドロキシアルキル基、ジアルキルアミノアルキル基、ヒドロキシアルコキシアルキル基、アルコキシアルキル基、ポリアルコキシアルキル基、アルコキシヒドロキシアルキル基およびジオキサニルアルキル基におけるアルキル部分についても当てはまる。ジオキサニルアルキル基は、ジオキサン環系がアルキル残基に結合

したものである。中でも、下に示すような1, 4-ジオキサソ環系をもつものが好ましい。

【0014】

【化4】



【0015】ポリアルコキシアルキル基は下に示すようなものである。

—アルキル— (アルコキシ)  $n$ —アルコキシ

ここで、 $n=1-10$ 。好ましくは、 $n=1-4$ 。特に  $n=1-3$  が好ましい。アルキレン残基は直鎖または分枝鎖（直鎖が好ましい）、飽和または不飽和（飽和が好ましい）の炭素原子数2-5（炭素原子数2-4が好ましい）の二つの遊離結合部位をもつ炭素水素鎖である。

【0016】アリール基またはアラルキル基中のアリールは、炭素原子6-10を有する芳香環系で、中でも、フェニルが好ましい。アンモニウム塩としては、アンモニウムイオン  $\text{NH}_4^+$  と、アルキル、アリールまたはアラルキル残基によりまたは多置換されたアンモニウムカチオンとがあげられる。

【0017】アルカリ塩としては、リチウム、ナトリウムまたはカリウム塩が好ましい。アルカリ土類金属塩としては、マグネシウムおよびカルシウム塩が好ましい。 $\text{R}^1$  残基としては、水素およびアルキル基が好ましく、特に、水素が好ましい。 $\text{R}^2$  残基としては、アルコキシ基とアミノ基  $\text{NR}^3$   $\text{R}^4$  が好ましい。

【0018】 $\text{R}^1$  と  $\text{R}^3$  によって形成され、鎖中に酸素、硫黄または窒素有するアルキレン残基の中では、一般式I中の窒素とともにモルフォリン、チオモルフォリンまたはピペラジン残基を形成するものが好ましい。特に、ピペラジン残基が好ましい。 $\text{R}^1$  と  $\text{R}^3$  によって形成されるアルキレン残基としては、一般式I中の芳香環とともにインドリンまたは1, 2, 3, 4-テトラヒドロキノリン残基を形成するものが好ましい。

【0019】本発明によれば、一般式Iのニトロソアニリン誘導体の塩としては、強酸塩が好ましく、特に、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸のような、無機酸の塩が好ましい。中でも、塩酸塩が特に好ましい。一般式Iで表されるニトロソ化合物の中で、次のものが好ましい。

N, N' -ビス- (2-ヒドロキシエチル) -p-ニトロソアニリン

N, N' -ジメチル-p-ニトロソアニリン

N, N' -ジエチル-p-ニトロソアニリン

N-メチル-N' - (4-ニトロソフェニル) -ピペラジン

N- (2-ヒドロキシエチル) -5-ニトロソインドリン

2, 4-ジメトキシニトロソベンゼン

N, N' -ビス- (2-メトキシエチル) -4-ニトロソアニリン

N- (4-ニトロソフェニル) -モルフォリン

N- (2, 2-ジエトキシエチル) -N' - (4-ニトロソフェニル) -ピペラジン

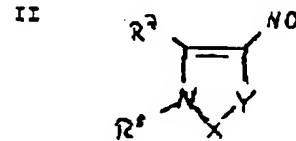
p-ニトロソフェノール

3-メトキシ-4-ニトロソフェノール

芳香環系の電子密度が非常に高いために、ニトロソ/オキシム互変異性およびイミンの形成に外部からの+M置換基を必要としないような、電子密度の高いヘテロ芳香族ニトロソ化合物の中では、ニトロソ基で置換されたピラゾロンおよびピラゾールが、なかでも、特に、たとえばUllmannの工業化学辞典、第5版、A20巻、72-74ページに記載されているようなニトロソ置換ピラゾロ化合物が、本発明の方法への使用に適している。この場合には、一般式IIで表される3-ニトロソピラゾロ化合物が好ましい。

【0020】

【化5】



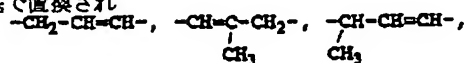
【0021】これらの化合物のほとんどは、ヨーロッパ特許出願、EP-A-0 433854に記載されるように、対応する3-アミノピラゾロ化合物合成用の前駆体としてよく知られている。化学式IIにおいて、X-Yは  $\text{NR}^5$  -COまたは  $\text{N}=\text{CR}^6$  を表す； $\text{R}^5$  は水素、アルキル基を表し、このアルキル基は、水酸基、カルボキシル基、 $\text{SO}_3\text{H}$ 、 $\text{PO}_3\text{H}_2$ 、ジアルキルホスフィニル基で置換されていてもよい； $\text{R}^6$  は水素、アルキル基、アルケニル基、アルコキシ基、アルキルチオ基、アリール基、アリールチオ基、アラルキル基を表し、これらの置換基は、それぞれ水酸基、カルボキシル基、 $\text{SO}_3\text{H}$ 、 $\text{PO}_3\text{H}_2$ 、これらの酸の塩、または/およびアルコキシカルボニル基で置換されていてもよく、あるいは、 $\text{R}^6$  はアミノ基を示し、このアミノ基は、アルキル基（または数個の水酸基、カルボキシル基または/およびアルコキシカルボニル基を有していてもよい）でまたは二置換されていてもよく、アミノ基がアルキル残基で二置換されている場合には、2つのアルキル残基は閉じて環を形成でき、この環は、窒素原子に加えて、環中に酸素、硫黄、または別の窒素原子が介在してもよく、あるいは、 $\text{R}^6$  はアミノ基を表し、このアミノ基は—または二個のアシル基、アルコキシ基または/およびアラルコキシカルボニル基、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}$ 、アルキル基、アラルキル基、または/およびアリールカルバモイル基によって置換されていてもよく、あるいは、 $\text{R}^6$  は、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、カルボキシアミド基またはハロゲンを示す； $\text{R}^7$  は、アルキル基、チオアルキル基またはアラルキル基を示し、これ

らは水酸基、カルボキシル基、 $\text{SO}_3\text{H}$ または $\text{PO}_3\text{H}_2$ で置換されていてもよく、あるいは、 $\text{R}^7$ はアミノ基を示し、このアミノ基はアルキル基（水酸基、カルボキシル基、 $\text{SO}_3\text{H}$ 、ジアルキルホスフィニル基または $\text{PO}_3\text{H}_2$ で置換されていてもよい）で—または二置換されていてもよい；ただし、 $\text{R}^6$ および $\text{R}^7$ の少なくともどちらか一方はアミノ基を表す； $\text{R}^8$ はアルキル基またはアラルキル基を表し、これらは水酸基、カルボキシル基、 $\text{SO}_3\text{H}$ または $\text{PO}_3\text{H}_2$ で置換されていてもよい。

【0022】あるいは、 $\text{R}^7$ および $\text{R}^8$ は、共同して、3または4員の窒素原子または炭素原子を有する飽和または不飽和鎖を表す。この場合、鎖中に1または数個の窒素または硫黄原子を有していてもよく、また、鎖中の炭素原子は、アルキル基、アルコキシ基、アルキルチオ基、水酸基、アラルキル基、アリール基、カルボキシル基、カルボキシアミド基、アルコキシカルボニル基、シアノ基、ハロゲン、アミノ基で置換されていてもよい。前記アミノ基は、水酸基、カルボキシル基または／およびアルコキシカルボニル基を1または数個有してもよいアルキル残基によって—または二置換されていてもよい。また、上記鎖中の二重結合を形成していない窒素原子は、アルキル基またはアラルキル基で置換されており、これらのアルキルまたはアラルキルは、水酸基、 $\text{SO}_3\text{H}$ 、 $\text{PO}_3\text{H}_2$ 、カルボキシル基またはジアルキルホスフィニル基で置換されていてもよい。2つの隣り合った鎖置換基は、アルキレン基を形成してもよく、このアルキレン基はアリール基で置換されるか、縮合環を形成していてもよい。

【0023】上記の化合物は、対応する互変異性体および塩の形を取っていてもよい。上記において、アルキル基は、アルキルチオ基、ジアルキルホスフィニル基、アルキルカルバモイル基およびアラルキル基中のアルキルも含めて、炭素原子数1-6、好ましくは、1-4の、直鎖または分枝アルキル残基を表す。たとえば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソブチル基または第三ブチル基があげられる。

【0024】アミノ基が2つのアルキル残基で置換され



【0030】ブタジエンジイル基（ $\text{—CH=CH—CH=CH—}$ ）およびテトラメチレン基（ $\text{—(CH}_2\text{)}_4\text{—}$ ）が好ましい。アルケニル基は、炭素原子数2-5の直鎖または分枝の炭素鎖で、少なくとも1つの二重結合を有する置換基である。たとえば、ビニル基が好ましい。ジアルキルホスフィニル基は下に示す置換基である。

ている場合、これらの置換基は閉じて環を形成し、全体として窒素原子を有する環となってもよい。この場合、上記のアミノ基は全体で5または6員環を形成するのが好ましく、環中に酸素、硫黄または窒素原子を有していてもよい。モルフォリノ基が特に好ましい。アルコキシ基は、アルコキシカルボニル基およびアラルコキシカルボニル基中のアルコキシも含めて、炭素原子数1-6、好ましくは1-4の直鎖または分枝アルコキシ基を表す。例として、メトキシ基、エトキシ基、プロピルオキシ基、イソブチルオキシ基または第三ブチルオキシ基があげられる。

【0025】アリール基は、アリールカルバモイル基中のアリールも含めて、炭素芳香族またはヘテロ芳香族残基を示す。環の原子数が6-10のものが好ましく、特に、フェニル基またはナフチル基が好ましい。このフェニル基またはナフチル基はさらにアルキル、アルコキシまたは／およびハロゲンで置換されていてもよい。なかでも、フェニル基が特に好ましい。

【0026】アラルキル基は、アラルキルカルバモイル基中のアラルキルも含めて、上に定義されたアルキル基が、上に特徴づけられたアリール残基で置換されたものである。ベンジル基が好ましい。アラルコキシ基、たとえば、アラルコキシカルボニル基中のアラルコキシは、上に定義されたアルコキシ基が、上に定義されたアリール残基で置換されたものである。ベンジルオキシ基が好ましい。

【0027】ハロゲンは、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素を表す。フッ素と塩素が好ましい。アシル基は、アルキル基、アラルキル基またはアリール基を含むことができるカルボン酸残基を表す。アセチル基、フェニルアセチル基またはベンゾイル基が好ましい。

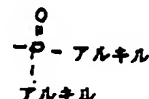
【0028】アルキレン基は、炭素原子3-5、好ましくは、3または4からなる直鎖または分枝の、飽和または不飽和の、炭化水素鎖で、2つの遊離結合部位を有するものである。例として、下記のものがあげられる。

【0029】

【化6】

【0031】

【化7】



【0032】この式において、アルキルは上で定義した

とおりである。ジメチルホスフィニル基が好ましい。S  
O<sub>3</sub> H、PO<sub>3</sub> H<sub>2</sub> およびカルボキシル基の塩として、  
アルカリ、アルカリ土類金属またはアンモニウム塩を用  
い得る。アルカリ塩としては、リチウム、ナトリウム、  
カリウム、ルビジウムおよびセシウム塩があげられる  
が、この中で、リチウム、ナトリウムおよびカリウム塩  
が、とりわけ、ナトリウムおよびカリウム塩が好まし  
い。アルカリ土類金属塩としては、ベリリウム、マグネ  
シウム、カルシウム、ストロンチウムまたはバリウム塩  
があげられる。マグネシウムおよびカルシウム塩が好ま  
しく、特に、カルシウム塩が好ましい。アンモニウム塩  
として、無置換のアンモニウムイオンNH<sub>4</sub><sup>+</sup>の塩が用  
いられる。一方、アンモニウムイオンが、1-4個のア  
ルキル、アリールまたはアラルキル残基で置換されてい  
るアンモニウム塩も用いることができる。これらの置換  
基の定義は上に記したとおりであるが、アルキル基とし  
てはメチル基、エチル基およびn-プロピル基が、アリ  
ール基としてはフェニル基が、アラルキル基としてはベン  
ジル基が、特に好ましい。

【0033】カルボキシアミド基としては、CONH<sub>2</sub>  
で表される置換基、および式中のアミノ基が1または2  
個のアルキル残基で置換されたものがある。上記のアル  
キル残基は1または数個の水酸基、カルボキシル基また  
は/およびアルコキシカルボニル基で置換されていても  
よい。本発明によれば、一般式IIのニトロソ化合物の中  
でも、R<sup>7</sup>とR<sup>8</sup>が、上記のように、飽和または不飽和  
の鎖を形成するような化合物が好ましい。この中で、こ  
の鎖が不飽和で、不飽和鎖上の窒素原子の自由電子対が  
二重結合および一般式IIの架橋窒素原子と共役してお  
り、この結果、縮合芳香環を形成しているものが特に好  
ましい。

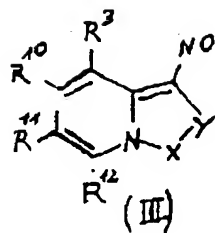
【0034】互変異性体も、一般式IIの物質として用い  
ることができる。これらの互変異性体も、一般式IIに含  
まれることを理解すべきである。本発明によれば、一般  
式IIIからXIIで表されるニトロソ化合物が好ましい。ま  
た、これらの互変異性体および塩も用いられる。

【0035】

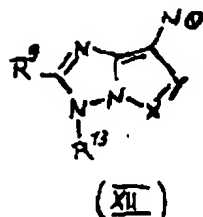
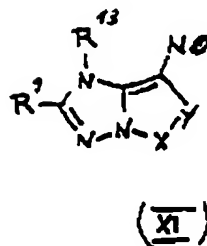
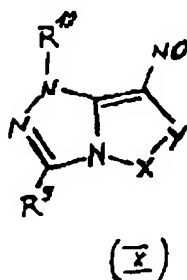
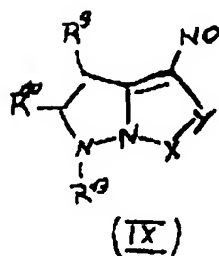
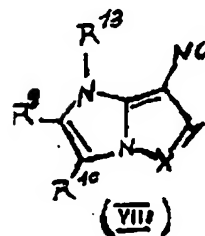
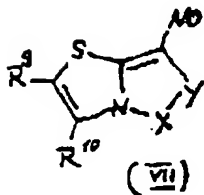
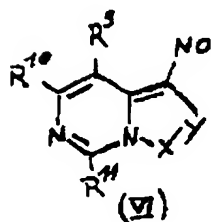
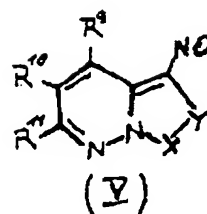
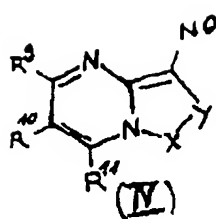
【化8】



13



14



【0036】上記の一般式において、X-Yの意味は上に記載したとおりである。R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>、R<sup>11</sup>およびR<sup>12</sup>は同一でも異なってもよく、水素、水酸基、アルキル基、アルコキシ基、アルキルチオ基、アラルキル基、アリール基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、カルボキシアミド基、シアノ基、アミノ基を表す。このアミノ基は、1または2個のアルキル基で置換されていてもよく、このアルキル基は1または数個の水酸基、カルボキシ基、または/およびアルコキシカルボニル基で置換されていてもよい。あるいは、R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>、R<sup>11</sup>およびR<sup>12</sup>は、ハロゲンを表す。この場合に2つの隣り合う置換基がアルキレン基を形成していてもよく、このアルキレン基はアリール基で置換されているか、縮合環を形成していてもよい。R<sup>13</sup>は、アルキル基またはアラルキル基を表し、これらは、水酸基、カルボキシ基、SO<sub>3</sub>H、PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>またはジアルキルホスフィニル基で置換されていてもよい。置換基の定義は、一般式IIについて記載したものと同一である。

【0037】本発明によれば、一般式III、IV、V、VI、VIIIおよびIXの物質、もしくは、対応する互変異性体およびこれらの塩を使用するのが特に好ましい。X-YがN=CR<sup>6</sup>を表し、R<sup>6</sup>が一般式Iで述べたとおりの置換基を表すような物質が特に好ましい。化合物、3-ニトロソ-2-メチルピラゾロー[1.5a]-ピリジン、3-ニトロソピラゾロー[1.5a]-ピリジンおよび3-ニトロソピラゾロー[3.2c]-s-トリアゾール、およびその塩、特に塩酸塩が、本発明への使用に際して、優れて適していることが立証された。

【0038】置換基を有する芳香族化合物、特に容易に置換可能な基を有するフェノールおよびナフトールが、カップラー物質BXとしての使用に適している。ハロゲン、特に臭素および塩素、または、SO<sub>3</sub>H基が、置換可能で、開裂可能な基として好ましく使用される。本発明における好ましい反応原理は、還元された化合物A'による、化合物BXの開裂可能な原子団Xの求核的芳香族置換である。

【0039】BXとして好ましい化合物は、2, 4, 6-トリハロゲン-3-ヒドロキシ安息香酸、2, 4-ジハロゲン-1-ナフトール、1-ナフトール-4-スルホン酸、4-モノハロゲンアニリン、4-モノハロゲンフェノールおよび4-モノハロゲンナフトールである。開裂した原子団X<sup>-</sup>の性質によってこの原子団の濃度は電流測定または電位差測定により、測定される。開裂した原子団がハロゲン化物イオンである場合、Ag/Agハロゲン化物電極またはカロメル電極に対する電位差測定により測定されるのが望ましい。その他の、たとえばSO<sub>3</sub><sup>-</sup>のような開裂可能な原子団は、電極上での酸化による電流測定によっても測定することができる。

【0040】開裂した原子団X<sup>-</sup>の電気化学的測定と同時に、カップリング生成物A' Bが呈する色も、比色法により測定される。これは、目視でも可能であるが、光度計を用いて測定するのが望ましい。比色測定は特に低濃度において有利であるのに対して、電気化学的測定は高濃度においてより精密な定量が可能なので、このプロセスにおいて、比色測定と電位差測定は、相互に理想的な形で補完しあっている。さらに、発色を、電気化学的検出システムの機能をモニターするのに利用することができる。

【0041】電流を直接測定するために、反応混合物を、開裂可能な原子団から電子を受け取ることができ、半電池の一つの電極を構成する、不活性固体電極（たとえばプラチナ電極）と接触させておく。その半電池は、還元反応が起こり得るような第二の電極（たとえば、銀/塩化銀電極、カロメル電極またはプラチナ/フェロシアン化物）と導電的に接続される。塩橋により、2つの電極間に液絡を形成することが望ましい。

【0042】開裂したイオンX<sup>-</sup>を電位差測定により測定するためには、たとえば塩化物イオンまたは臭化物イオン感應性電極のような、イオン感應性電極を使うと有利である。このような電極としてはいろいろなものが市販されている。適正な電極の配備および測定の方法は、当業者には公知である。この本発明の方法は、水溶液中、即ち電気化学的に不活性な溶液(non-electrochemically active solution)中で実施されるのが望ましい。この方法の実施に当たって、適正なpH値を維持するため、特に、使用する酵素に適したpH値を維持するため、本発明の試験薬は緩衝剤を含有することが好ましい。試験溶液はpH値が4-9、特に5-7となるような緩衝液とするといふ。

【0043】本発明の試験薬は、溶液の状態で提供されても、あるいは、その溶液を吸収性または膨潤性担体に

加えて乾燥した状態で提供されてもよい。溶液の状態で提供される場合には、試験薬には本方法に必要な試薬がすべて含有されていることが望ましい。溶剤としては、水、および水と水溶性有機溶剤、たとえば、メタノール、エタノール、アセトンまたはジメチルホルムアミドとの混合物が挙げられる。安定性上の理由から、試験に必要な試薬を2から数種類の溶液に分けておいて、実際の分析に当たって初めて混合することが有利である。使用する合成電子受容体の濃度は、測定する被検体の濃度に依存する。

【0044】本発明の方法によって測定される被検体の標準的な濃度は、10<sup>-6</sup>から10<sup>-2</sup>モル/l、特に10<sup>-5</sup>から10<sup>-2</sup>モル/lである。対応する合成電子受容体Aの標準的な濃度は、10<sup>-4</sup>から10<sup>-1</sup>モル/lである。酸化酵素の濃度はその活性と被検体の濃度に依存する。酵素濃度の標準的な値はキューベット試験の場合、1 mU/mlから1 U/mlである。

【0045】カップリング可能な化合物BXは、少なくとも、化合物Aと化学量論的な比率で用いられるが、1.5-2倍多く用いることが望ましい。本発明の試験薬は、試験ストリップの形で提供することもできる。このような試験ストリップに関しては様々な態様が知られている。試験ストリップにおいては本測定方法を実施するのに必要な試薬は固体の担体層状に存在する。分析される試験液で湿らせる担体層としては、吸収性および/または膨潤性材料が挙げられる。試薬は担体材料の中または上に固体の状態で存在する。試験液を試験ストリップ上にたらすか、試験ストリップを試験液に浸すかすると、試験ストリップ中に液体の環境が形成され、この中で検出反応が進行する。この場合、開裂可能な原子団X<sup>-</sup>を測定するためには、電極が上記の反応混合物の液体の環境と導電的に液絡している必要がある。

【0046】試験ストリップ上の個々の試薬の好ましい濃度は次の通りである。

被検体 標準的には10<sup>-4</sup>から10<sup>-1</sup>M

色原体A 10<sup>-3</sup>から1M

カップリング可能な物質BX 10<sup>-3</sup>から1M

酵素 試験ゾーンあたり0.1から100U

【0047】

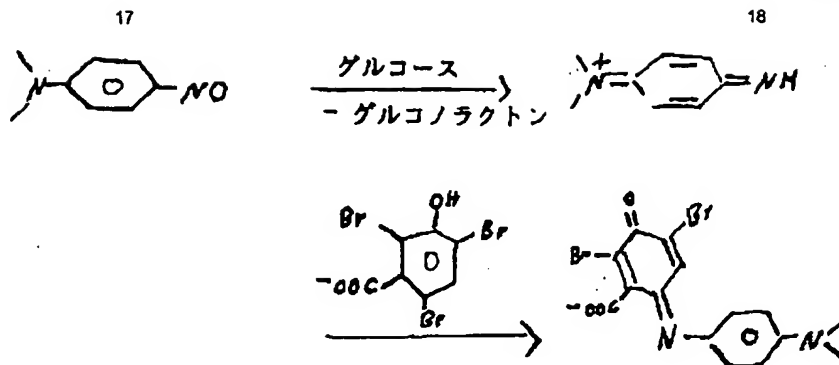
【実施例】

実施例1

色素形成および電気化学的検出によるグルコースの検出反応式

【0048】

【化9】



【0049】測定混合物（最終的な濃度）：  
 100mM クエン酸塩緩衝液 pH5.8  
 10mM 2, 4, 6-トリプロモ-3-ヒドロキシ安息香酸  
 1mM N, N-ビス-(2-ヒドロキシエチル)-4-ニトロソアニリン  
 10U/ml グルコース-色素-オキシドレダクターゼ (PQQ-依存グルコースデヒドロゲナーゼ)  
 0.1M硝酸ナトリウム  
 グルコースは被検体として、100から500 $\mu$ Mの間で、濃度を変化させて添加される。

測定

a) 電気化学的測定

キノンジイミンA' の2, 4, 6-トリプロモ-3-ヒドロキシ安息香酸との還元的カップリングにより生成す

る臭化物イオンをIngold社製, Type 373-90-WTE-ISE-S7のイオン感応性電極と、これと連結したKnick社製 (Type 763) の小型電圧計を用いて測定する。結果を図1に示す。

b) 比色測定

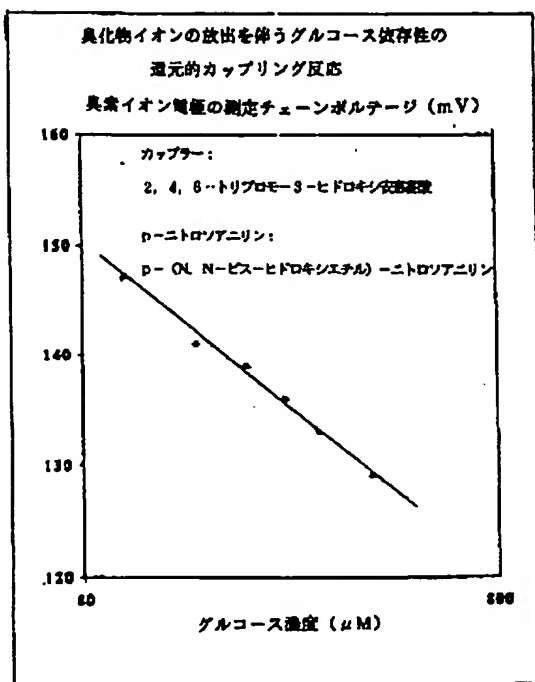
グルコース濃度の増加とともに臭化物イオン濃度が増加（臭化物イオン感応性電極の測定チェーンボルテージ (measuring chain voltage) が減少）するのに平行して、 $\lambda_{max} = 705 \text{ nm}$ の緑色の色素 A' Bの生成が増加するのが観察される（図2）。

【図面の簡単な説明】

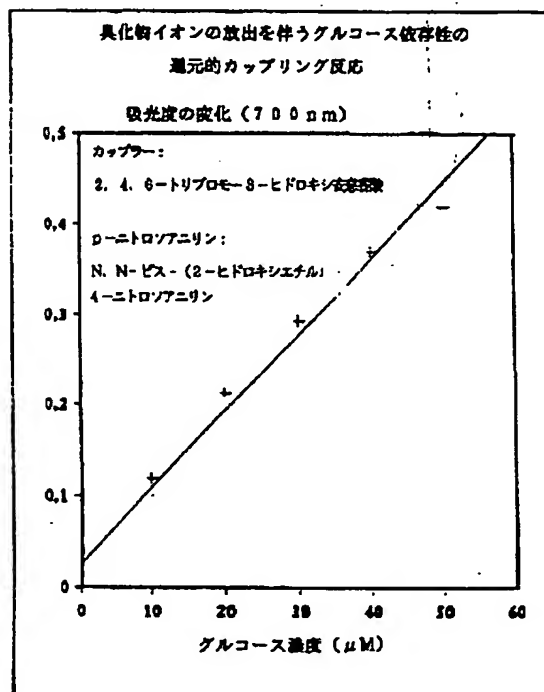
【図1】実施例1による臭化物イオンの電気化学的測定の結果を示す図である。

【図2】実施例1による緑色色素A' Bの比色測定の結果を示す図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 ホルガー コーツァン  
ドイツ連邦共和国 ディー-68526 ラー  
デンプルグ, レアルシュルシュトラッセ  
25番地

(72)発明者 ヴォルカー ウンクリーク  
ドイツ連邦共和国 ディー-68526 ラー  
デンプルグ, シュタールビュールリンク  
27番地  
(72)発明者 ミッシェル マルカント  
ドイツ連邦共和国 ディー-68305 マン  
ハイム, グリュックスブルガー ヴェー  
ク 58番地